

Device and method for detecting bioelectric signals from electrophysiologically active regions in spheroids**Publication number:** US2004209351**Publication date:** 2004-10-21**Inventor:** THIELECKE HAGEN (DE); ROBITZKI ANDRES (DE)**Applicant:****Classification:****- international:** C12M1/34; G01N15/12; G01N15/14; C12M1/34; G01N15/10; G01N15/14; (IPC1-7): C12M1/34**- European:** C12M1/34B; G01N15/12B2; G01N15/14H3**Application number:** US20040487711 20040226**Priority number(s):** DE20011042393 20010830; WO2002EP09267 20020820**Also published as:**

WO03020125 (A3)



WO03020125 (A2)



EP1421380 (A3)



EP1421380 (A2)



EP1421380 (A0)

more >>

Report a data error here**Abstract of US2004209351**

Disclosed is a device for detecting bioelectric signals from spheroids comprising a measuring chamber having a measuring chamber wall which encloses a volume, which is open at least at one side, is composed of an electrically non-conducting material, and has, in at least one measuring region, an inner cross section, which corresponds as far as possible to the largest cross section of a spheroid, comprising at least a number of electrodes which are disposed in a common plane inside said measuring chamber wall and each electrode has a freely accessible electrode surface which is oriented towards the measuring region, and comprising an impedance measuring arrangement which is connected to the electrodes. The device and the method can be used to test substances in 3D biological in-vitro (three-dimensional) cell aggregates.

Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide



⑮ **BUNDESREPUBLIK
DEUTSCHLAND**



**DEUTSCHES
PATENT- UND
MARKENAMT**

⑫ **Patentschrift**
⑩ **DE 101 42 393 C 1**

⑤① Int. Cl.⁷:
G 01 N 27/02
G 01 N 33/15
G 01 N 33/48
G 01 R 27/02

⑳ Aktenzeichen: 101 42 393.4-52
㉔ Anmeldetag: 30. 8. 2001
④③ Offenlegungstag: –
④⑤ Veröffentlichungstag
der Patenterteilung: 23. 1. 2003

Innerhalb von 3 Monaten nach Veröffentlichung der Erteilung kann Einspruch erhoben werden

⑦③ **Patentinhaber:**
Fraunhofer-Gesellschaft zur Förderung der
angewandten Forschung e.V., 80636 München, DE

⑦④ **Vertreter:**
Rösler, U., Dipl.-Phys.Univ., Pat.-Anw., 81241
München

⑦② **Erfinder:**
Thielecke, Hagen, Dipl.-Ing., 66386 St. Ingbert, DE;
Robitzki, Andrea, Dr., 68519 Viernheim, DE

⑤⑥ **Für die Beurteilung der Patentfähigkeit in Betracht
gezogene Druckschriften:**

DE 199 53 424 A1
DE 199 46 458 A1

Sensors and Actuators B, 34 (1996), S. 270-275;
Proc. Soc. Exp. Bio. Med., 92 (1956), S. 410-416;
Neurosci. Lett., 48 (1984), S. 191-196;

⑤④ **Vorrichtung und Verfahren zur Erfassung bioelektrischer Signale aus elektrophysiologisch aktiven Bereichen in
Sphäroiden**

⑤⑦ Beschrieben wird eine Vorrichtung sowie ein Verfahren
zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden mit
einer Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein
zumindest einseitig offenes Volumen umschließt, aus
elektrisch nicht leitendem Material besteht und zumin-
dest in einem Messbereich einen Innenquerschnitt auf-
weist, der maximal dem größten Querschnitt eines Sphä-
roids entspricht, mindestens einer Anzahl von Elektroden,
die in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkam-
merwand angeordnet sind und jeweils eine zum Messbe-
reich orientierte, frei zugängliche Elektrodenoberfläche
aufweisen, sowie einer Impedanzmessanordnung, die
mit den Elektroden verbunden sind.
Die Vorrichtung sowie das Verfahren lassen sich zu Wirk-
stofftests an biologischen in vitro 3-D (dreidimensiona-
len) Zellaggregaten einsetzen.

DE 101 42 393 C 1

DE 101 42 393 C 1

Beschreibung

Technisches Gebiet

[0001] Die Erfindung bezieht sich auf eine Vorrichtung sowie auf ein Verfahren zum Erfassen bioelektrischer Signale aus elektrophysiologisch aktiven Bereichen in Sphäroiden. Insbesondere wird dargelegt, wie die Wirkung pharmazeutischer vorzugsweise neuropharmakologischer oder neurotoxischer Wirkstoffe auf Sphäroide erfasst werden können ohne dabei die Sphäroide zu schädigen, so dass sie weiteren Untersuchungsmöglichkeiten zu Verfügung stehen können.

Stand der Technik

[0002] Um die Wirkung von Substanzen, bspw. pharmakologische Wirkstoffe auf lebende Systeme routinemäßig erfassen zu können, sind in den letzten Jahren Biosensoren entwickelt worden, die auf lebenden Zellen basieren, siehe hierzu Bousse, L.: "Whole Cell Biosensors", Sensors and Actuators B 34 (1996), 270-275. Derartige, auf biologischen Zellen basierende Biosensoren weisen hauptsächlich Monolayer-Zellkulturen als biologisches Erkennungssystem auf, doch können Wirkstoffverursachte komplexe Zell/Zell- oder Zell/Matrix-Interaktionen durch derartige Monolayer-Zellkulturen oft nicht mit der gewünschten Genauigkeit und Zuverlässigkeit technisch erfasst werden. Hinzukommt, dass die Wirkung von Neuropharmaka oder Umwelttoxine eben gerade jene komplexe Zell/Zell-Interaktionen im Zentralen Nervensystem zur Folge haben, die es gilt messtechnisch zu erfassen, um weitere Einblicke in die biochemische Reaktionskette derartiger Substanzen auf biologisches Zellmaterial zu erhalten. Schließlich weisen die auf Monolayer-Zellkulturen basierenden Biosensoren den Nachteil auf, dass die mit diesen Sensoren erhältlichen Messergebnisse nur über einen beschränkten Aussagegehalt über das tatsächliche Reaktionsvermögen biologischer Zellen bspw. auf einen gezielten Wirkstoffeintrag, verfügen, zumal die Monolayer-Zellkulturen in dieser Form in der belebten Natur nicht vorkommen.

[0003] Um diesen Nachteil zu vermeiden ist man bei der Untersuchung derartiger Substanzen vielmehr auf biologische Modelle angewiesen, die der in vivo Situation hinsichtlich der interzellulären sowie intrazellulären Interaktionen möglichst nahe kommen. Dreidimensionale Zellsysteme spiegeln die in vivo Situation wesentlich besser wider als einzelne Zellen oder Monolayer-Zellkulturen. Somit ist es notwendig, zum Test von Wirkstoffen, die auf die Beeinflussung der Zell/Zell-Interaktionen zielen, dreidimensionale Zellsysteme zu verwenden.

[0004] Um die neuropharmakologischen oder neurotoxischen Wirkung von Substanzen bspw. außerhalb von Tiermodellen zu Testen, werden in an sich bekannter Weise bioelektrische Signale von ex vivo Gewebeschnitten mit Hilfe von Glasmikroelektroden oder Nadelelektroden abgeleitet. Zur Aufzeichnung von Signalverläufen mittels Multikanalableitungen werden planare Elektrodenanordnungen, sogenannte Multielektrodenarrays eingesetzt. Jedoch müssen ex vivo Gewebeschnitte aufwendig aus Tiermodellen präpariert werden, sind nicht standardisierbar und auf die vorhandenen Tiermodelle beschränkt. Da überdies ex vivo Gewebeschnitte schnell degenerieren, sind Gewebeschnitte für Langzeituntersuchungen nicht geeignet. Dies jedoch wäre bei der Untersuchung von Neuropharmaka oder Umwelttoxine und ihr Einfluss auf biologische Gewebe von äußerst hoher Relevanz.

[0005] Ein interessantes Untersuchungsobjekt für die vor-

stehend aufgeworfene Fragestellung sind sogenannte Sphäroide, die als kugelförmige Zellaggregate aufgefasst werden können. Aus der Literatur sind bspw. Untersuchungen der Retinogenese und der Retinaregeneration bekannt, bei denen unter konstanten Bedingungen derartige regenerierte kugelförmige Zellaggregate, sogenannte Retinosphäroide, gewonnen werden (siehe hierzu Moscona, A. A.: "Development of Heterotypic Combination of Dissociated Embryonic Chick Cells". Proc. Soc. Exp. Bio. Med 92, 410-416 (1956); Vollmer, G., Layer, P. G., Gierer, A.: "Reaggregation of Embryonic Chick Retina Cells: Pigment Epithelial Cells Induce a High Order of Stratification". Neurosci. Lett. 48, 191 196 (1984)). Diese werden durch geeignete Kultivierung von dissoziierten Zellen aus embryonalen Retinae reaggregiert.

[0006] In der DE 199 53 424 A1 wird ein Verfahren und eine Anordnung, um Sphäroide automatisch mit einer für Routineuntersuchungen adäquaten Homogenität herzustellen, beschrieben. Die Sphäroide werden einzeln charakterisiert und anschließend vereinzelt. Hierzu werden die Sphäroide in einem Zuchtreaktor in einen, gesteuerten Strom des Kulturmediums gezogen, der hinsichtlich seiner Parameter so eingestellt ist, dass die gravitationsbedingten Bewegungen der Sphäroide einer bestimmten, an sich aber beliebigen Dichte und Größe kompensiert werden. Anschließend werden die Sphäroide unter Nutzung eines Druckgefälles an dieser Stelle dem Zuchtreaktor entnommen, vereinzelt und definiert abgelegt.

[0007] Darüber hinaus beschreibt die DE 199 46 458 A1 eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zur Charakterisierung von Sphäroiden mittels Impedanzspektroskopie beschrieben. Damit kann der Einfluss von Substanzen auf die Proliferation, Morphologie und Membraneigenschaften der in vitro Gewebe, d. h. außerhalb des lebenden Organismus, bestimmt werden. Ortsaufgelöste Informationen aus dem Inneren des Sphäroids können jedoch mit der bekannten Methode nicht gewonnen werden. Auch ist es mit der in vorstehender Druckschrift beschriebenen Vorrichtung nicht möglich Informationen über intrazelluläre elektrische Potentiale in Form sogenannter bioelektrischer Signale zu erhalten, an Hand derer die Wirkung pharmazeutischer Wirkstoffe, insbesondere von neuropharmakologischen oder neurotoxischen Wirkstoffen erfasst werden kann.

Darstellung der Erfindung

[0008] Es besteht die Aufgabe eine Vorrichtung sowie ein Verfahren zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden derart anzugeben, dass es möglich ist die neurotoxische und neuropharmakologische Wirkung von Substanzen auf biologisches Material im Wege einer in vitro Untersuchung möglichst nahe an der in vivo Situation hinsichtlich der interzellulären sowie intrazellulären Interaktionen zu erfassen.

[0009] Die Lösung der der Erfindung zugrundeliegenden Aufgabe ist im Anspruch 1 angegeben. Gegenstand des Anspruchs 14 ist ein erfindungsgemäßes Verfahren. Den Erfindungsgedanken vorteilhaft weiterbildende Merkmale sind Gegenstand der Unteransprüche sowie der Beschreibung unter Bezugnahme auf die Ausführungsbeispiele zu entnehmen.

[0010] Erfindungsgemäß weist die Vorrichtung zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden die nachfolgenden Komponenten auf:

- Eine Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein zumindest einseitig offenes Volumen umschließt, aus elektrisch nicht leitendem Material besteht und zumindest in einem Messbereich einen Innenquerschnitt

aufweist, der maximal dem größten Querschnitt eines Sphäroids entspricht.

Vorzugsweise ist die Messkammer als Kapillare ausgebildet, mit Kapillarwänden und einem Kapillarboden, die den Messbereich für das Sphäroid definieren. Die Querschnittsgröße des von den Kapillarwänden eingeschlossenen Messbereiches ist derart gewählt, dass das Sphäroid längs seines größten Umfangsrandes in mechanischen Kontakt zur Messkammer- bzw. Kapillarwand steht, so dass das Sphäroid innerhalb des Messbereiches eine möglichst feste Raumlage einnimmt, die für die weitere Messung des Sphäroids von großem Vorteil ist. Um die Positionierung des Sphäroids innerhalb der Messkammer bzw. Kapillare weiter zu verbessern ist in einer bevorzugten Ausführungsform der Vorrichtung im Kapillarboden eine Unterdruckleitung angeschlossen, um das Sphäroid mittels Saugwirkung regelrecht in innerhalb des Messbereiches zu fixieren.

Mindestens eine Anzahl von Elektroden sind in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet, wobei die Elektroden jeweils eine, zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche aufweisen. Die Elektroden sind vorzugsweise in jener Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet in der das Sphäroid mit seinem größten Umfangsrand die Messkammerwand berührt. Die vorstehende Forderung, dass die Elektroden in einer Ebene angeordnet sind, ist nicht notwendigerweise mathematisch exakt zu verstehen, d. h. im Sinne einer, der Messkammerinnenwand umlaufenden gedachten Linie. Die Elektroden sollten zumindest mit ihren zum Messbereich orientierten Elektrodenoberflächen längs des Kontaktbereiches zwischen Sphäroid und Messkammerwand angeordnet sein, so dass es mit einer an die einzelnen Elektroden angeschlossenen Impedanzmessanordnung möglich ist die Impedanzverteilung orts aufgelöst in der durch die Elektrodenanordnung vorgegebenen Schnittebene innerhalb des Sphäroids zu ermitteln. Hierbei wird über die einzelnen Elektroden innerhalb des Sphäroids ein elektrischer Strom induziert und die über dem Sphäroid abfallende elektrische Spannung gemessen. Aus Strom und Spannung wird die Impedanz gebildet. Zur Durchführung eines sogenannten Impedanzimaging wird die Frequenz des in den Sphäroid induzierten Stroms über einen zusammenhängenden Frequenzbereich variiert und die sich dabei ergebende Impedanz als Funktion der Frequenz aufgezeichnet. So ist es mit Hilfe eines derartigen Impedanzimaging-Systems möglich aus der aufgezeichneten Impedanzverteilung bei verschiedenen Frequenzen die Gewebeparameter innerhalb der Schnittebene orts aufgelöst zu ermitteln. Man erhält auf diese Weise Kenntnis über den inneren Aufbau des Sphäroids innerhalb der Schnittebene. So zeichnen sich sogenannte elektrophysiologisch aktive Bereiche durch eine in der Konsistenz kompakte Untereinheit aus, die sich von übrigen nicht organisierten Bereichen innerhalb des Sphäroids im Impedanzverhalten zu unterscheiden vermögen. Eben gerade diese elektrophysiologisch aktiven Bereiche sind von großem Interesse bei der Fragestellung der Auswirkung bestimmter Wirkstoffe auf biologische Zellen, zumal in diesen Bereichen als eine Art Zellantwort auf das Einwirken eines Wirkstoffes auf die jeweilige Zelle technisch erfassbare und auswertbare Signale erzeugt werden.

[0011] So verfügen elektrophysiologisch aktive Bereiche innerhalb des Sphäroids über eine bioelektrische Aktivität,

durch die das elektrische Oberflächenpotenzialverhalten des gesamten Sphäroids beeinflusst wird. Ändert sich bspw. durch Einwirken einer bestimmten Substanz auf das Sphäroid und damit zugleich auf die elektrophysiologisch aktiven Bereiche dessen bioelektrische Aktivität, so wirkt sich dies direkt auf das Oberflächenpotenzial des Sphäroids aus. Vorzugsweise mit Hilfe eines Potenzialableitungssystem, das mit den um das Sphäroid angeordneten Elektroden verbunden ist, ist man in der Lage Oberflächenpotenziale längs der Schnittebene durch das Sphäroid zu erfassen und letztendlich eine Information über die bioelektrische Aktivität der innerhalb der Schnittebene befindlichen elektrophysiologisch aktiven Bereiche zu erhalten.

[0012] Sowohl für die Impedanzmessung als auch für das Erfassen der Oberflächenpotenziale müssen die freien Elektrodenoberflächen nicht notwendigerweise in unmittelbarem Kontakt zur Oberfläche des Sphäroids stehen. Vielmehr dient auch eine innerhalb der Messkammer eingebrachte Kulturflüssigkeit, die bspw. das Nährmedium darstellt innerhalb der das Sphäroid gezüchtet wird, als elektrisch leitendes Medium, durch das ein elektrischer Kontakt zwischen den Elektroden und der Oberfläche des Sphäroids herstellbar ist.

[0013] In einer einfachen Ausführungsform schließen die freien Elektrodenoberflächen bündig mit der Innenwand der Messkammer ab, so dass ein direkter Kontakt zwischen den Elektrodenoberflächen und dem Sphäroid vorherrscht.

[0014] In einer alternativen Ausführungsform befinden sich die Elektroden derart innerhalb sogenannter Verbindungskammern, die einseitig offen in die Messkammer münden, dass die freien Elektrodenoberflächen von der Messkammerinnenwand zurückversetzt sind. Dies hat zunächst den Vorteil, dass die Elektroden leichter austauschbar bzw. auswechselbar sind und überdies können bei geeigneter geometrischer Ausbildung und Anordnung der Verbindungskammern, bspw. zur Messkammer konisch zulaufend, größere freie Elektrodenoberflächen eingesetzt werden. In Hinblick auf eine möglichst geringe Phasengrenzimpedanz ist der Einsatz möglichst großer Elektrodenflächen wünschenswert, die durch entsprechende beabstandete Anordnung innerhalb konisch ausgebildeter Verbindungskammern von der Messkammerinnenwand realisierbar sind. Wie bereits vorstehend erwähnt dient die Kulturflüssigkeit, die zusammen mit dem Sphäroid in der Messkammer eingebracht ist, als elektrisches Kontaktmedium zwischen den Elektroden und der Sphäroidoberfläche.

[0015] Insbesondere in Hinblick auf die Untersuchung von Sphäroiden im industriellen Massstab, um die Wirkungsweise neuer pharmakologischer Wirkstoffe zu testen, eignen sich Halbleitermaterialien für den Aufbau der vorstehend beschriebenen Vorrichtung. Mit den Mitteln der Halbleitertechnik lassen sich eine Vielzahl arrayförmig angeordneter Messkammern realisieren, die in Form und Größe für Untersuchung von Sphäroiden angepasst sind und erlauben somit eine statistische Auswertung aufgrund einer großen Anzahl untersuchter Sphäroide. Ein konkretes Ausführungsbeispiel hierzu wird unter Bezugnahme der im weiteren beschriebenen Figuren genauer dargelegt.

[0016] Mit Hilfe der vorstehenden Vorrichtung lassen sich Sphäroide, ohne sie zu zerstören, auf ihre bioelektrische Aktivität hin untersuchen, um sie nachfolgend schadlos zur weiteren Beobachtung in ein Kulturmedium zurückzuführen. So ist es möglich ein und dasselbe Sphäroid in zeitlichen Abständen mehrmals zu vermessen, um etwaige Wirkstoff-bedingte Degradationserscheinungen feststellen zu können. Hierdurch können nach Auswertung einer Vielzahl derartiger Sphäroide, die innerhalb eines Kulturmediums zusätzlich einem bestimmten Wirkstoff ausgesetzt sind, sta-

tistische Aussagen über die Wirkungsweise von Wirkstoffen getroffen werden.

[0017] Im besonderen zeichnet sich das erfindungsgemäße Verfahren zur Erfassung bioelektrischer Signale aus Sphäroiden durch die Kombination folgender Verfahrensschritte aus: Bereitstellen einer Vorrichtung der vorstehend beschriebenen Art, Einbringen und Positionieren eines Sphäroids innerhalb der Messkammer sowie Durchführen einer Impedanzmessung nach der Impedanzimaging-Methode zur orts aufgelösten Bestimmung elektrophysiologisch aktiver Bereiche in dem Sphäroid. Um die bioelektrische Aktivität bestimmen zu können wird zusätzlich eine Oberflächenpotenzialmessung längs der durch die Elektrodenanordnung vorgegebenen Schnittebene durchgeführt.

[0018] Mit Hilfe des erfindungsgemäßen Verfahrens kann zum einen die Morphologie von multizellulären Sphäroiden orts aufgelöst und nicht invasiv bestimmt und zudem können die Erregungsverläufe von elektrophysiologisch aktiven Bereichen in Sphäroiden präzise ermittelt werden. Insbesondere ermöglicht das Verfahren, dass die Wirkung von Substanzen bzw. Wirkstoffen auf 3D in vitro Modelle des zentralen Nervensystems non invasiv erfasst werden kann. Durch die vorstehend erläuterte Vorrichtung im Sinne eines Biosensorsystems können Langzeituntersuchungen der neurotoxischen und neuropharmakologischen Wirkung von Substanzen realisiert werden. Das biologische Erkennungselement eingesetzte Sphäroid wird nur für einen kurzen Zeitraum während der Impedanzmessung und Potenzialableitung in die Messkammer positioniert und kann unabhängig von der Messanordnung unter physiologischen Bedingungen kultiviert werden. Eine Adhäsion des Sphäroids wird durch die Gegenwart der Kulturflüssigkeit innerhalb der Messkammer weitgehend verhindert und unerwünschte Zell/Material-Wechselwirkungen werden minimiert. Je nach Fragestellung können somit für das Biosensorsystem Sphäroide oder 3D biologische Erkennungselemente mit unterschiedlichen Zelltypen in unterschiedlichen Lagen erzeugt werden.

Kurze Beschreibung der Erfindung

[0019] Die Erfindung wird nachstehend ohne Beschränkung des allgemeinen Erfindungsgedankens anhand von Ausführungsbeispielen unter Bezugnahme auf die Zeichnung exemplarisch beschrieben. Es zeigen:

[0020] Fig. 1 Schematische Flussdiagrammdarstellung zur Durchführung des Analyseverfahrens,

[0021] Fig. 2a, b Darstellungen einer Messkammer mit Sphäroid,

[0022] Fig. 3a, b, c Querschnittsdarstellungen durch ein Sphäroid sowie Potentialbildaufnahme,

[0023] Fig. 4 Querschnitt durch eine arrayförmige Messanordnung in Halbleitertechnologie,

[0024] Fig. 5 Messanordnung,

[0025] Fig. 6 Querschnitt durch eine Messkammer sowie

[0026] Fig. 7 Querschnitt durch eine alternative Messkammer.

Wege zur Ausführung der Erfindung, gewerbliche Verwendbarkeit.

[0027] Am Beispiel der Untersuchung von reaggregierten Retinosphäroiden soll das erfindungsgemäße Verfahren unter Bezugnahme auf Fig. 1 erläutert werden:

Dissoziierte embryonale Zellen des zentralen Nervensystems werden in einem Bioreaktor 1 unter Mikrogravitationsbedingungen zu kugelförmigen neuronalen Reaggregationskulturen den sogenannten Retinosphäroiden reaggregiert.

Durch Zugabe von geeigneten Wachstumsfaktoren und/oder durch geeignete genetische Manipulationen wird erreicht, dass sich elektrophysiologisch aktive Zellbereiche im Sphäroid gleich verteilt ausbilden. Somit befindet sich in einer beliebigen Schnittebene, die durch das Zentrum des Sphäroids verläuft, mit hoher Wahrscheinlichkeit mindestens ein elektrophysiologisch aktiver Bereich.

[0028] Um die Wirkung einer Substanz auf die Sphäroide zu testen, ist wenigstens ein Sphäroid 2 aus dem Bioreaktor 1 zu isolieren und in Messkammer des Biosensorsystem 3 zu verbringen, um es dort als in vitro Modell zu testen. Sowohl im Bioreaktor 1 als auch in der Messkammer des Biosensors 3 befindet sich das Sphäroid 2 in einer Kulturflüssigkeit bzw. Analyt, so dass das Sphäroid beliebig zwischen dem Bioreaktor und der Messkammer ohne dabei Schaden zu erleiden austauschbar ist.

[0029] Mittels Multifrequenz-Impedanzimaging 4 wird die Lage und Ausdehnung der verschiedenen Zellbereiche in einer durch die Elektrodenanordnung innerhalb der Messkammer vorgegebenen Querschnittebene bestimmt, und anschließend durch elektrisches Quellenimaging 5 die bioelektrische Aktivität der einzelnen Zellbereiche in der Schnittebene ermittelt. Systeme und Algorithmen für das Impedanzimaging und das elektrische Quellenimaging sind grundsätzlich aus der medizinischen Tomographie bekannt, siehe Webster, J. G.: "Electrical Impedance Tomography". Adam Hilger, Bristol (1990).

[0030] Als Parameter 6 für die Wirkung von Substanzen auf das in vitro Gewebemodell dienen Änderungen der elektrophysiologischen Aktivität von bestimmten Bereichen im Sphäroid, die Korrelation der elektrophysiologischen Aktivität unterschiedlicher Bereiche sowie die Änderung von Gewebeparametern.

[0031] Zur Durchführung des Impedanzimaging und der Potentialableitung wird ein elektrophysiologisch aktiver Sphäroid 2 gemäß Fig. 2 im gewünschten Kulturstadium in eine Messkammer 7 positioniert. Je nach Fragestellung, wie z. B. Langzeituntersuchungen oder dynamische Stimulation, wird die zu prüfende Substanz der Kulturflüssigkeit im Bioreaktor oder der Kulturflüssigkeit in der Messkammer 7 zugegeben. Die Messkammer 7 wird vorzugsweise durch eine Kapillare 8 gebildet, die im Positionierbereich zylindrisch ausgebildet ist und deren Wand 9 aus elektrisch isolierendem Material besteht. Im Positionierbereich der Kapillare 8 sind in der Kapillarwand 9 in mindestens einer senkrecht zur Längsachse stehenden Ebene eine Vielzahl von Elektroden 10 angeordnet. Da die Elektroden 10 mit ihren freien Elektrodenoberflächen in dem in Fig. 2a, b gezeigten Ausführungsbeispiel bündig zur Messkammerinnenwand angeordnet sind, berühren sie den im Inneren der Messkammer eingebrachten Sphäroid 2 (Fig. 2b) längs seines größten Umfangs in einer Schnittebene. Die Elektroden sind einzeln von außen zur Ansteuerung elektrisch kontaktiert (nicht dargestellt).

[0032] Diese Anordnung dient sowohl zur orts aufgelösten Bestimmung der passiven elektrischen Eigenschaften des in vitro Gewebes als auch zur Bestimmung des räumlichen und zeitlichen Verlaufs der elektrophysiologischen Erregung.

[0033] Zur Ermittlung der Impedanzverteilung der Schnittebene des Sphäroids, in der die Elektroden liegen, werden die Elektroden in geeigneter Weise mit einem Impedanzimaging-System verbunden. Aus den Impedanzverteilungen bei verschiedenen Frequenzen werden die Gewebeparameter orts aufgelöst ermittelt.

[0034] Hierzu ist in Fig. 3a ein tatsächlicher Schnitt durch ein Sphäroid dargestellt, der typischerweise nicht weiter organisierte Bereiche 11, organisierte Unterbereiche, die sogenannten elektrophysiologisch aktiven Bereiche 12 sowie in-

nere Faserschichten 13 aufweist. In Fig. 3b ist ein mittels Impedanzimaging ermitteltes Schnittbild dargestellt, das dem in Fig. 3a tatsächlich wiedergegebenen Schnittbild entspricht. Die bioelektrische Aktivität bestimmter Bereiche wird aus den Oberflächenpotentialen, die mit den Elektroden abgeleitet werden, sowie aus der Impedanzverteilung bestimmt, siehe die Diagrammdarstellung in Fig. 3c. Bei der Ableitung der Oberflächenpotentiale sind die Elektroden der Messkapillare mit einem Ableitsystem verbunden. Markante auswertbare Messsignale stellen insbesondere die an der Sphäroidoberfläche wahrnehmbaren Spannungspaks (siehe Diagrammdarstellung) sowie deren zeitliche Aufeinanderfolge (Δt_1 , Δt_2) dar. Eben jene Messgrößen werden durch die Gegenwart bestimmter Wirkstoffe nachweislich beeinflusst, wodurch Aussagen über die Wirkung bestimmter Substanzen auf biologisches Material getroffen werden können.

[0035] In Fig. 4 ist eine Messkammeranordnung dargestellt, bei der auf einem planaren Substrat 14 in einer Array-Struktur eine Vielzahl einzelner Messkammern 7 angeordnet sind. Zur Herstellung einer derartigen Messkammeranordnung wird auf einem Siliziumsubstrat 14 eine Siliziumnitridschicht 15 mit ca. 1 µm Dicke abgeschieden. Die Siliziumnitridschicht 15 wird als Membranen von ihrer Unterseite freigelegt. Ferner werden Mikrolöcher 16 mit 20 µm Durchmesser in die Membrane 15 durch Trockenätzen eingebracht. Anschließend wird ein Photolack 17 mit einer Dicke von 40 µm aufgebracht. Im Photolack 17 werden konzentrisch zu den Mikrolöchern zylinderförmige Messkammern 7 (Durchmesser 150 µm) freigeätzt. Auf dem Photolack 17 wird eine Metallschicht in einer Dicke von 10 µm abgeschieden und so strukturiert, dass die Messkammern 7 von acht kreisförmig angeordneten, äquidistant beabstandeten Elektroden 10 umgeben sind. Anschließend wird erneut eine Photolackschicht 17 (50 µm) abgeschieden und strukturiert.

[0036] Um die Sphäroide beim Einbringen in die einzelnen Messkammern 7 nicht zu beschädigen, werden die Kanten der Messkammern 7 abgerundet. Damit ein Unterdruck 18 zur Positionierung der Sphäroide angelegt werden kann, wird die gefertigte Mikrostruktur auf eine Platte mit Bohrung und Schlauchanschluss geklebt. Zur Durchführung einer Messung wird der gesamte Bereich der Messkammer 7 mit einer Kulturflüssigkeit 19 gefüllt, um Adhäsionseffekte zwischen den einzelnen Sphäroiden und der Messkammerwand zu vermeiden.

[0037] Die Elektroden 10 die in der Messkammer eingebracht sind gemäß Fig. 5 über einen Multiplexer 20 mit einem Impedanzmesssystem 21 und mit einem Potenzialableitsystem 22 verbunden. Die Messdaten werden an eine Datenerfassungs- und Analyseeinheit 23 übertragen, die auch den Multiplexer 20 steuert.

[0038] Gemäß Ausführungsbeispiel in Fig. 6, die einen Querschnitt durch eine Messkammer 7 zeigt, sind sternförmig um die Messkammer 7 konisch zulaufende Verbindungskammern 24 angeordnet, die in die Messkammer einmünden. Dadurch kann die Größe der Metallelektroden 10, die mit jeweils durch Leiterbahnen 10* kontaktiert sind, unabhängig von der Größe der Messkammer gewählt werden, und die Phasengrenzimpedanz der Elektroden 10 lässt sich durch größere Elektrodenflächen verringern.

[0039] In einem weiteren Ausführungsbeispiel gemäß Fig. 7 sind zur Realisierung von Impedanzmessungen in einer Vier-Elektroden-Anordnung in jedem Kanal eine Elektrode 10' zur Stromeinspeisung und eine zur Potentialableitung 10'' angeordnet.

Bezugszeichenliste

- 1 Bioreaktor
- 2 Sphäroid
- 3 Biosensor, Messanordnung
- 4 Impedanzmessanordnung
- 5 Potenzialableitungsanordnung
- 6 Auswerteparameter
- 7 Messkammer
- 8 Kapillare
- 9 Messkammerwand
- 10 Elektrode
- 10* Leiterbahn
- 10' Elektrode zur Stromeinspeisung
- 10'' Elektrode zur Potenzialableitung
- 11 Nicht organisierter Bereich
- 12 Organisierter Bereich, elektrophysiologischer Bereich
- 13 Innere Faserschicht
- 14 Substrat
- 15 Membran
- 16 Mikroloch
- 17 Photolack
- 18 Unterdruckanschluss
- 19 Kulturflüssigkeit
- 20 Multiplexer
- 21 Impedanzsystem
- 22 Potenzialableitungssystem
- 23 Datenerfassungs- und analysesystem
- 24 Verbindungskammer

Patentansprüche

1. Vorrichtung zum Erfassen bioelektrischer Signale aus Sphäroiden mit einer Messkammer mit einer Messkammerwand, die ein zumindest einseitig offenes Volumen umschließt, aus elektrisch nicht leitendem Material besteht und einen Innenquerschnitt aufweist, der maximal dem größten Querschnitt eines Sphäroids entspricht, einer Anzahl von Elektroden, die in einer gemeinsamen Ebene innerhalb der Messkammerwand angeordnet sind und jeweils eine, zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche aufweisen, sowie einer Impedanzmessanordnung, die mit den Elektroden verbunden sind.
2. Vorrichtung nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, dass ein Potenzialableitungssystem mit den Elektroden verbunden ist.
3. Vorrichtung nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, dass die Messkammer in Art einer zylindrischen Kapillare ausgebildet ist, dass die Anzahl von Elektroden in einer Ebene orthogonal zur Längsrichtung der Kapillare angeordnet ist.
4. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass die frei zugänglichen Elektrodenoberflächen der Elektroden bündig mit der Messkammerinnenwand ausgebildet sind.
5. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb der Messkammerwand eine Anzahl von Verbindungskammern vorgesehen sind, die mit dem Messbereich offen verbunden sind und in einer gemeinsamen Ebene, im Umfangsrichtung um den Messbereich gleich verteilt angeordnet sind, und dass innerhalb der Verbindungskammern jeweils eine Elektrode eingebracht ist, deren zum Messbereich orientierte frei zugängliche Elektrodenoberfläche von der Messkammerinnenwand beab-

standet ist.

6. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 5, dadurch gekennzeichnet, dass die Messkammer mit einer elektrisch leitenden Flüssigkeit befüllbar ist.

7. Vorrichtung nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, dass innerhalb der Verbindungskammern jeweils eine zweite Elektrode vorgesehen ist, die mit dem Potenzialableitungssystem verbunden ist.

8. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, dass mit der Messkammer eine Unterdruckleitung verbunden ist.

9. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, dass die Messkammer topfförmig ausgebildet ist, und dass am Topfboden eine Unterdruckleitung vorgesehen ist, zur Positionierung und Fixierung eines in die topfförmige Messkammer eingebrachten Sphäroids mittels Unterdruck.

10. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 9, dadurch gekennzeichnet, dass die Impedanzmessanordnung sowie das Potenzialableitungssystem über einen Multiplexer mit den Elektroden verbunden sind.

11. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 10, dadurch gekennzeichnet, dass eine Datenerfassungs- und Datenauswerteeinheit mit der Impedanzmessanordnung sowie dem Potenzialableitungssystem verbunden ist.

12. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 11, dadurch gekennzeichnet, dass eine Vielzahl von Messkammern arrayförmig angeordnet und in planarer Halbleitersubstrattechnik ausgebildet ist.

13. Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 12, dadurch gekennzeichnet, dass die Elektroden in Umfangsrichtung der Messkammerwand gleich verteilt angeordnet sind.

14. Verfahren zur Erfassung bioelektrischer Signale aus Sphäroiden durch die Kombination folgender Verfahrensschritte:

– Bereitstellen einer Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13,

Einbringen und Positionieren eines Sphäroids innerhalb der Messkammer

– Durchführen einer Impedanzmessung nach der Impedanzimaging-Methode zur orts aufgelösten Bestimmung elektrophysiologisch aktiver Bereiche in dem Sphäroid.

15. Verfahren nach Anspruch 14, dadurch gekennzeichnet, dass eine Oberflächenpotenzialmessung zur Erfassung der bioelektrischen Aktivität durchgeführt wird.

16. Verfahren nach Anspruch 14 oder 15, dadurch gekennzeichnet, dass die Impedanzmessung bei unterschiedlichen Anregungsfrequenzen durchgeführt wird, um ein Impedanzspektrum zu erhalten.

17. Verwendung der Vorrichtung nach einem der Ansprüche 1 bis 13 zur Untersuchung der Wirkung von Wirkstoffen auf Sphäroide.

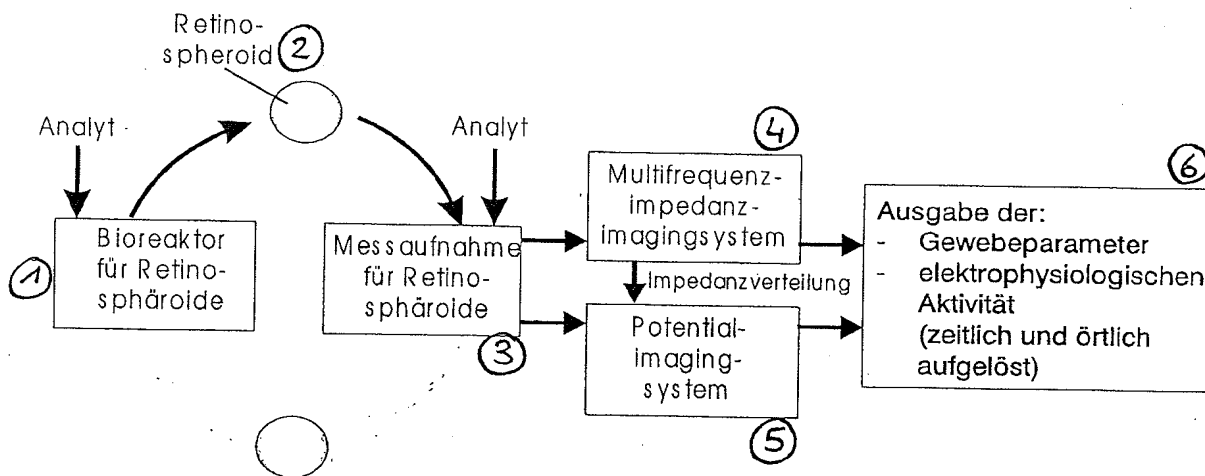
18. Verwendung nach Anspruch 17, dadurch gekennzeichnet, dass die Wirkstoffe pharmazeutische Wirkstoffe, insbesondere neuropharmakologische oder neurotoxische Substanzen sind.

19. Verfahren zur Untersuchung der Wirkung von Wirkstoffen auf Sphäroid mit einer Vorrichtung gemäß einem der Ansprüche 1 bis 13, dadurch gekennzeichnet, dass in einem ersten Schritt ein mit einem Wirkstoff versetzter Sphäroid aus einem Kulturmedium entnommen und in die Messkammer der Vorrichtung eingebracht wird,

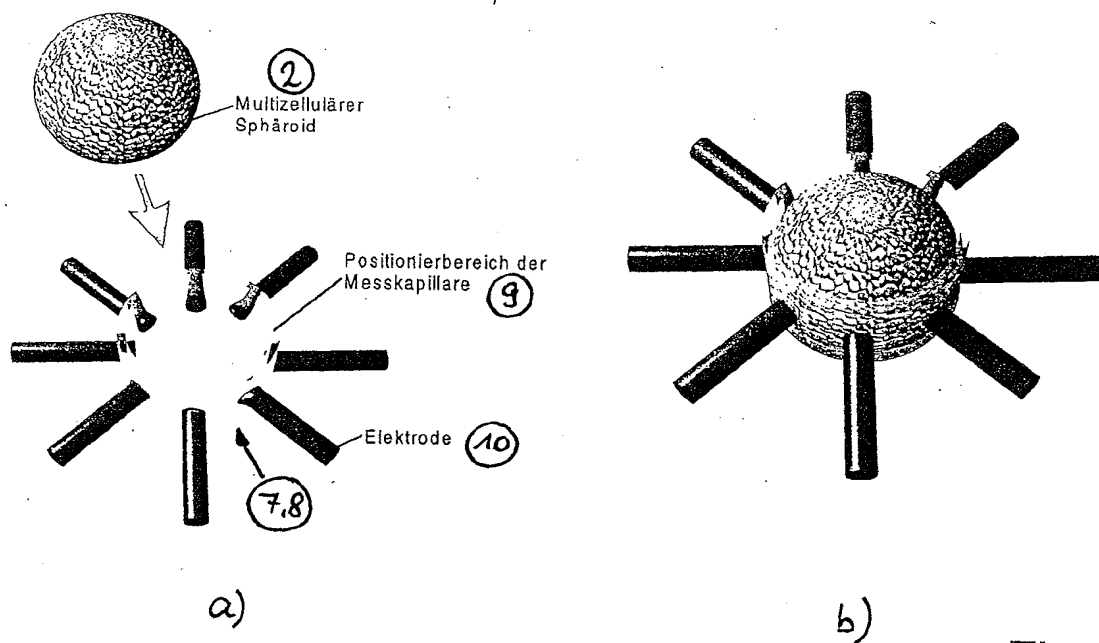
in einem darauffolgenden Schritt wird die Impedanz-

messung und/oder die Potenzialableitung non invasiv am Sphäroid durchgeführt und in einem letzten Schritt wird das Sphäroid in das Kulturmedium schadlos zurück verbracht.

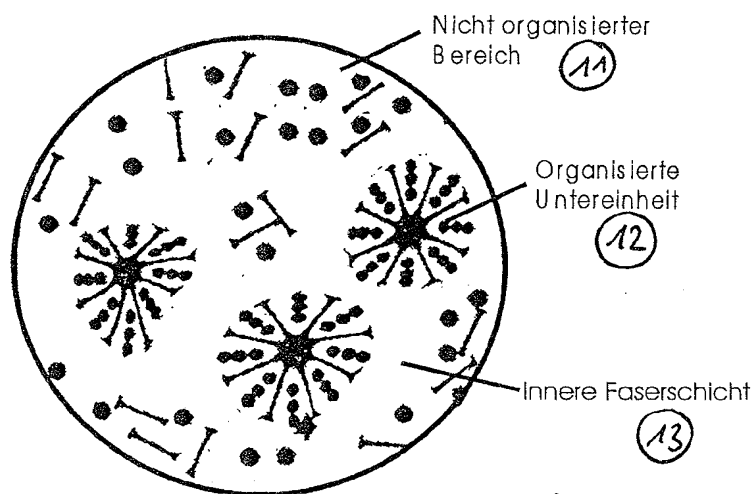
Hierzu 4 Seite(n) Zeichnungen



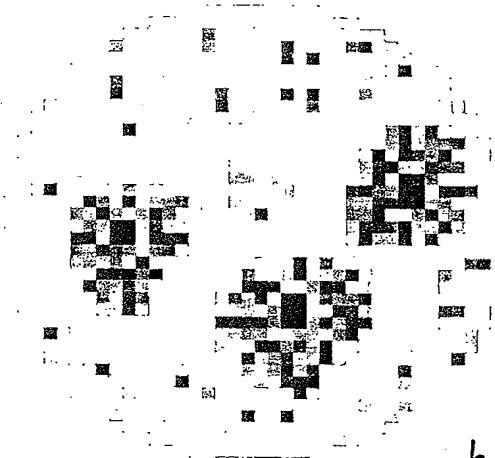
Figur 1



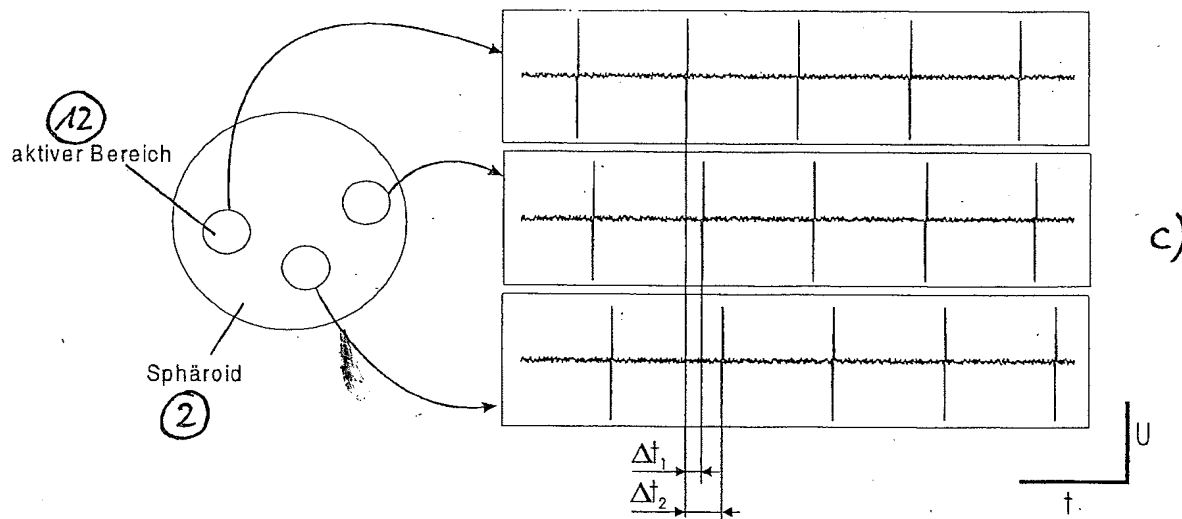
Figur 2



a)

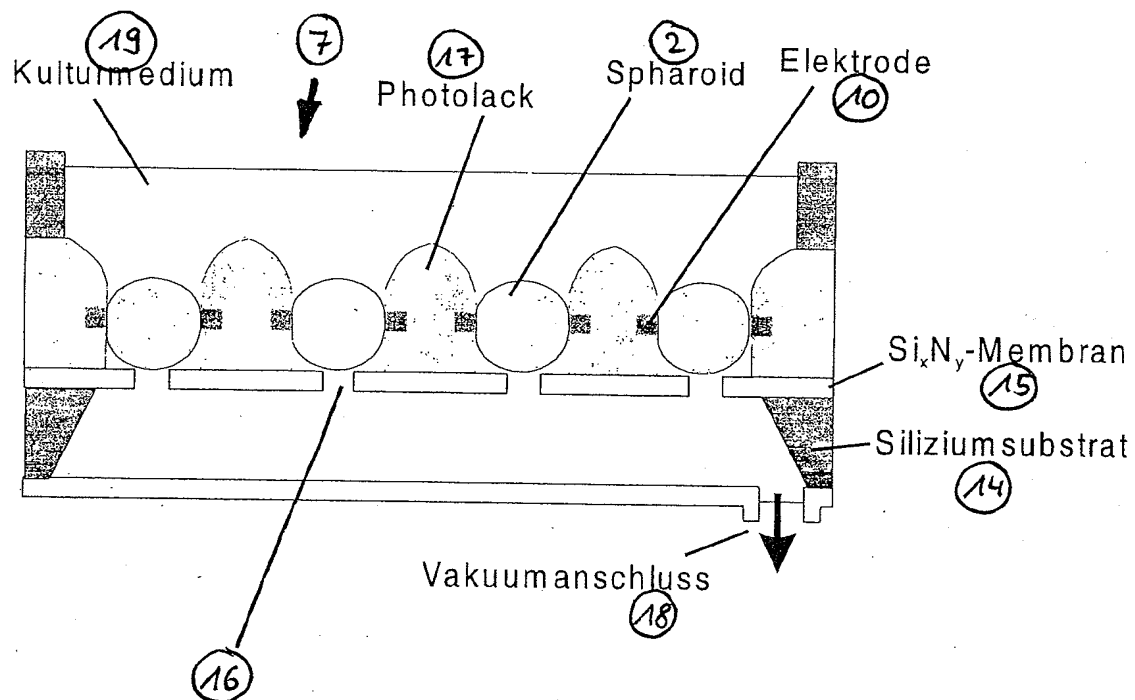


b)

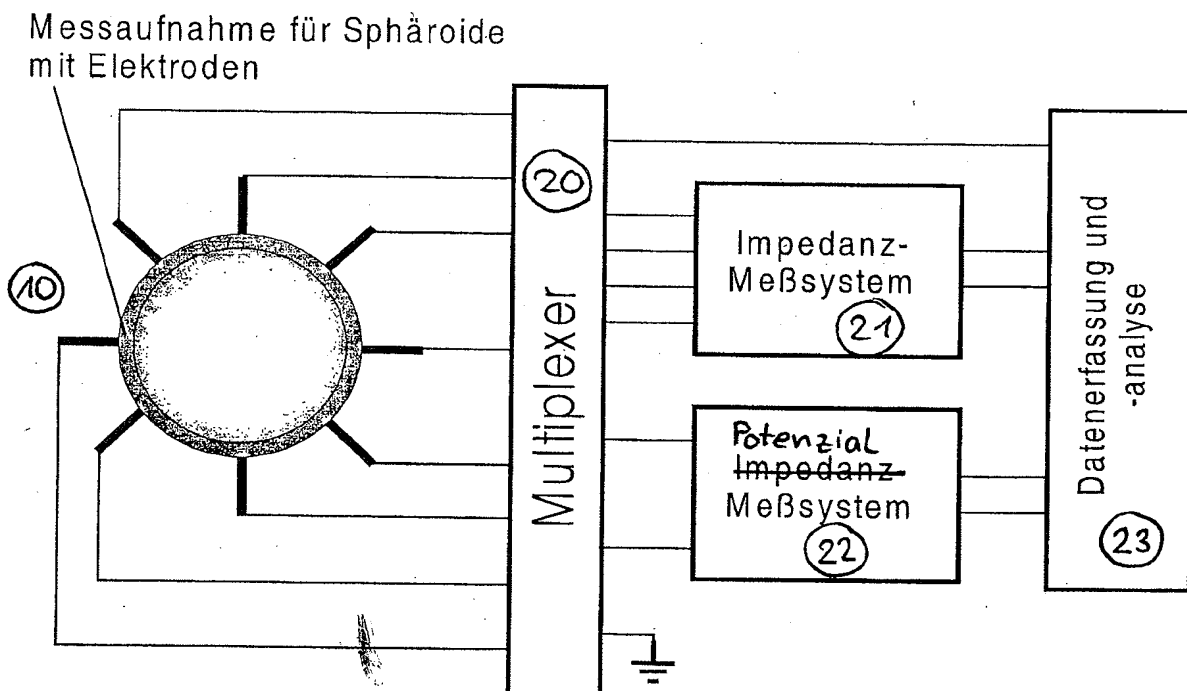


c)

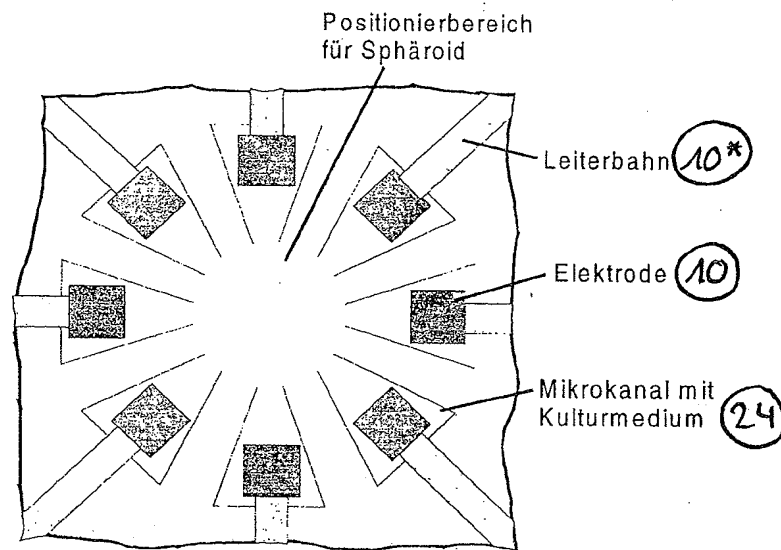
Figur 3



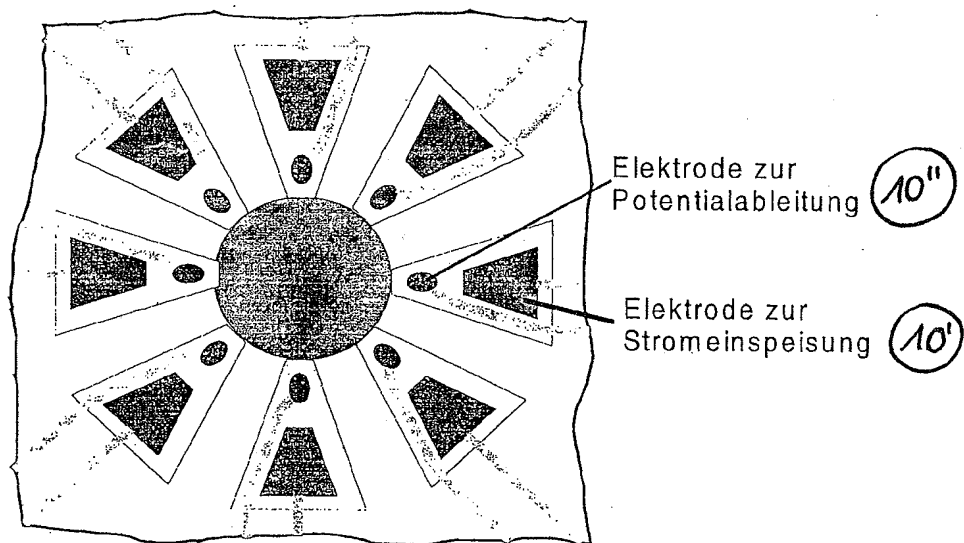
Figur 4



Figur 5



Figur 6



Figur 7